

# 単細胞緑藻 *Haematococcus lacvtrix* の astaxanthin に関する研究

著者	中添 純一
号	223
発行年	1977
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16717">http://hdl.handle.net/10097/16717</a>

氏 名 (本籍)                      なか                      ぞえ                      じゅん                      いち  
中                      添                      純                      一

学 位 の 種 類                      農                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      農 博 第                      2 2 3                      号

学位授与年月日                      昭和 5 3 年                      3 月 2 4 日

学位授与の要件                      学位規則第 5 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻                      東北大学大学院農学研究科  
(博士課程) 水産学専攻

学位論文題目                      単細胞緑藻 *Haematococcus*  
*lacustris* の astaxanthin に関  
する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 秦                      満 夫                      教授 佐 藤 隆 平

教授 須 藤 俊 造

# 論文内容要旨

## 序 文

本論文は、緑藻における含有 carotenoids の分析を行ない、astaxanthin の生合成経路を明らかにし、生合成された astaxanthin の、水産動物の体色改善への利用および標識 astaxanthin として利用する為の脂肪酸部分の除去方法について研究を行なったものである。

Keto-carotenoid の 1 つである astaxanthin (図 1) は、多くの水産生物の体色・肉色に帰与するので水産利用上重要である。

Astaxanthin は、一時動物に特有の carotenoid と思われたが、Tischer<sup>(1)</sup> (1937) は、単細胞緑藻 Haematococcus pluvialis において、最初に植物の astaxanthin の存在を報告した。以後、かなりの種類の緑藻においてその存在が報告されているが、主として単細胞緑藻である。又、緑藻以外の植物では、僅かに Adonis annua の花卉、酵母の一種 Paffia において報告されているだけである。Astaxanthin を生合成する緑藻においても、盛んに増殖している状態では、 $\beta$ -carotene, lutein, epoxy carotenoids が主であるが、一種の cyst を形成する際に astaxanthin を蓄積する。

動物との最大の違いは、これらの緑藻が、astaxanthin を de novo に合成するという点にあるが、水酸基・keto 基を持つ、その生合成経路として、 $\beta$ -carotene, echinenone を経ることが示唆されたものの確認されていなかった。<sup>(2)</sup>

動物では、astaxanthin の生合成経路として、金魚型および甲殻類型に大別できる。金魚は zeaxanthin を、甲殻類は  $\beta$ -carotene を出発物質とし、astaxanthin を生合成する。

緑藻における astaxanthin の生合成が、どの経路を取るか、動物における経路との比較という点で意味がある。

又、初めに記したように、astaxanthin は水産利用上重要なものである。

特に水産増養殖が盛んになるにつれ，その対象動物の体色の劣化が見られ，改善の努力が払われた。

これらのうち，サケ・マスおよびマダイは，astaxanthinの前駆物質を持たない。Astaxanthinを含む生物を飼料として供給するのは困難であるのでサケ・マスでは，次善としてcanthaxanthinを飼料に添加している。マダイでは，canthaxanthinその他の赤色を呈するcarotenoidsを蓄積せず，astaxanthinそれ自体を投与する必要がある。<sup>(31)</sup>このastaxanthin源として，astaxanthinを生合成する緑藻の利用が考えられる。

Carotenoidsの吸収・蓄積・代謝に関する研究は多くないが，astaxanthinについては特に少ない。これは，標識astaxanthinの入手が困難な事が，大きな理由である。この調整<sup>調整</sup>には緑藻の利用が考えられるが，緑藻に存在するastaxanthinは，脂肪酸とのesterを形成している。標識は脂肪酸部分もされるので，緑藻を利用して調整<sup>調整</sup>するには，脂肪酸部分の除去が必要である。

以下，この順で要約する。

尚，astaxanthinを生合成する緑藻としては，単細胞緑藻・Haematococcus lacustris (Girod) Lostaf (C-394) を使用した。(以下では，単に本種と称する。)

## 本 論

### I. 単細胞緑藻・Haematococcus lacustris における

#### astaxanthinの生合成

本種には，carotenoidsとして， $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -zeacarotene, lutein, zeaxanthin, antheraxanthin 様，violaxanthin 様，neoxanthin および keto-carotenoids として，echinenone, adonirubin ester, astaxanthin monoester, astaxanthin diester が存在する。

栄養塩に富む培地では，初期には $\beta$ -carotene, lutein および, neoxanthin 等の epoxy carotenoids が主である。この培地でも，30日間培養

を行なうと、keto-carotenoids の増加がみられ、特に astaxanthin の両 ester の和は 30 % に達する（表 1）。この間に、全色素量も 3 倍近く増加する。貧栄養で培養した場合には更に短い 10 日間で astaxanthin は 60 % 以上になり、全色素量も 3 倍以上に増加する。

細胞内での astaxanthin の存在形態をみる為に細胞成分の分画を行なった。培養期間の異なる試料 A～D から、油球画分を得て carotenoids の分析をしたが、表 2 の試料 B は、astaxanthin の生合成を促す為に貧栄養培地に移植直後のもの、D は 19 日後のもので大きな赤い油球がみられた。油球画分は後者が多いが、共に astaxanthin が主であり、細胞全体と油球画分を比べると、油球画分の carotenoids 組成変化は小さい。

Astaxanthin は油球中に選択的に収込まれ、 $\beta$ -carotene、lutein および epoxy carotenoids は、chloroplast 内に止まることが明らかになった。又、油球の発達した試料の chloroplast 画分の分析の結果、chloroplast に存在する carotenoids は全体から比べると僅かであるが、このうち 30 % 程が astaxanthin であった。

本種の全脂質の脂肪酸は  $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$  が主である。Astaxanthin ester の構成脂肪酸も同様であるが、より不飽和度が高い。

本種の astaxanthin の生合成経路を明らかにする目的で、培地中に、 $^{14}C$ -Na-acetate を添加して 16 時間取込ませた後、貧栄養培地に移し 11 日間培養した。この間、予定に従い試料を採取し、carotenoids 組成、各 carotenoid の放射能を求めた。3～4 日目より astaxanthin の増加が見られ、10 日目には 65 % 以上となると共に、astaxanthin 量は 20 倍以上に増加する。

Adonirubin も、astaxanthin 同様の傾向を示すが、astaxanthin と比べると増加は少ない。その他の carotenoids では、培養期間が長くなるにつれ、組成比が減少するが、色素量としての変化は小さい。

比放射能（表 3）を見た場合、 $\beta$ -carotene および一群の keto-

carotenoids は、一時増加した後、減少を示すが、lutein は、一時増加した後、ほぼ一定となる。全放射能（図 2）は、astaxanthin、adonirubin では増加が著しく、lutein では変化が少なく、 $\beta$ -carotene、echinenone では減少する。

以上の結果、 $\beta$ -carotene と echinenone は活発に生合成と他の carotenoid への変換を行なっていることを示し、更に、本種に見られる carotenoids の構造の比較より、本種では  $\beta$ -carotene  $\rightarrow$  echinenone  $\rightarrow$  adonirubin  $\rightarrow$  astaxanthin という生合成系の存在することが明らかとなった。Astaxanthin は、それまで存在していた carotenoids を原料とするよりも、de novo に生合成され、又、lutein は前駆物質と成らない。

この系の存在を確認する目的で、carotenoids の生合成阻害剤である、nicotine および piperonyl butoxide (P.B) を培地中に添加し、本種の培養を行なった。両阻害剤の添加により、astaxanthin の蓄積が阻害された。高濃度の nicotine では、lycopene の、低濃度では lycopene、 $\gamma$ -carotene、 $\delta$ -carotene、echinenone の蓄積が見られた。又、P.B. では、加えないものと比べて  $\alpha$ -carotene および  $\beta$ -carotene の増加が見られた。これは、astaxanthin の生合成過程（図 3）のうち、nicotine が①を、P.B が②を阻害した結果と解釈される。

更に、本種の homogenate と共に  $^{14}\text{C}$ - $\beta$ -carotene および、 $^{14}\text{C}$ -adonirubin ester を反応させた結果（表 4）、何れも astaxanthin に放射能が認められ、これらが astaxanthin の前駆物質であることが確認できた。又、 $^{14}\text{C}$ - $\beta$ -carotene を基質とした場合には、echinenone および adonirubin にも放射能が認められた。

以上の結果を総合すると本種には 図 3 に示した生合成系が存在する。

## II 種々の astaxanthin 源としての利用

### 1. 水産動物の体色改善の為に astaxanthin 源として

本種は、細胞壁が堅固であり、そのままでは利用が困難である。金魚を用いて、細胞の処理方法を検討した結果（表5）、French Press を用いて細胞を破壊した場合では、astaxanthin その他の蓄積が認められたが、無処理のもの、酸やアルカリで処理した場合では、体色への影響は小さかった。

マダイに対しては、本種を French Press およびセルラーゼで処理し投与した場合と、astaxanthin（抽出物）、Spirulina、Scenedesmus を投与した場合の比較を行なった。その結果（表6）、マダイの体色に帰与する astaxanthin の蓄積が認められたのは、前3者のみであり、Spirulina、Scenedesmus のように astaxanthin を含まない藻類を添加した場合には、他の xanthophylls の蓄積が認められただけであった。各群の飼料中に含まれる astaxanthin 量は異なるが、astaxanthin の蓄積率は、astaxanthin を投与した場合で約1%、本種を添加した両群では共に約0.5%であった。従って、本種を French Press 又はセルラーゼで処理することにより、水産動物の体色改善に利用することが可能である。

## 2. 標識 astaxanthin の生合成の利用——特に ester 型から遊離型への調製——

本種を利用して標識 astaxanthin を調製することは、先に示したように可能であるが、ester 型として存在する為、同時に標識された脂肪酸を除く必要がある。アルカリけん化では、astaxanthin が astacene となる為、この変化を生じない、生体又は抽出した消化酵素の利用が必要である。

生体としては、遊離型 astaxanthin を体表に蓄積するアメリカザリガニを用い、astaxanthin diester および monoester を飼料に添加して投与した。外骨格には、投与量の約7%が蓄積され、その40%が遊離型であった。即ち、脂肪酸を除いた遊離型としての回収率は2～3%となった。

消化酵素源としては、ニジマス・金魚・マゴイを使用した。どの場合でも、astaxanthin の構造の変化を生ぜずに、遊離型への調製が可能であった。加水分解反応の至適 PH は8～12と広い範囲に存在した。魚種又は酵素源とし

た内臓等による活性の差は表7に示した。マゴイの消化管内容物の活性が最も高かったが、金魚でも、事前に投餌を行なうことにより、十分な活性を持った酵素が得られる。遊離型 astaxanthin の回収率は、1 回の反応で、金魚では 20 % 近く、マゴイ消化管内容物で 25 % 以上が期待される。この値は未反応の基質を回収することにより、更に上げることができる。

従って、生体又は抽出消化酵素を応用することにより、本種を標識 astaxanthin の調製に用いることが可能である。

## 結 論

本種、即ち、単細胞緑藻・Haematococcus lacustris (C-394) には astaxanthin の生合成系として図3に示した系が存在する。本種は astaxanthin を de novo 合成するという点で、動物と大きく異なるが、 $\beta$ -carotene 以降の経路のみを比較すると、 $\beta$ -carotene の keto 化を行なう甲殻類型の系を持ち、zeaxanthin の keto 化を行なう金魚型とは異なる。又、lutein は astaxanthin の前駆物質とは成り得ない。

生合成された astaxanthin は、油球中に選択的に収められる。

このようにして本種に蓄積された astaxanthin は、マダイのように、astaxanthin が体色に影響を持ち、且、astaxanthin の生合成能力を持たない水産動物の体色改善に利用できる。

本種を利用した標識 astaxanthin の調製も可能である。実際の使用に際しては、同時に標識される脂肪酸部分を除くことが必要であるが、アルカリけん化は astaxanthin  $\rightarrow$  astacene という反応を併う為利用できない。この問題はザリガニ等の遊離型 astaxanthin を蓄積する生物、又は、魚類の消化酵素の使用により解決できる。

以上のように、本種は astaxanthin の全生合成系を持つ点で比較生化学的に重要であるばかりでなく、種々の astaxanthin 源として利用できるという



点でも有用な生物といえる。

### 参 考 文 献

- (1) J. Tischer: Z. Physiol. Chem., 250, 147 (1937)
- (2) T. W. Goodwin; in "Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry" ed. by T.W. Goodwin  
P315—352  
(Academic press 1971)
- (3) T. Katayama et al.; Bull. Japan. Soc. Sci.  
Fish., 38, 1399—1403 (1972)

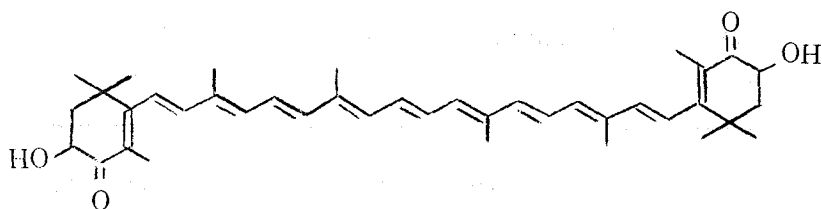


Fig. 1. Structure of astaxanthin.

Table 1. Carotenoid composition of *H. lacustris*

carotenoid	culture age	
	5 day	30 day
$\beta$ -carotene	22.1%	14.1%
echinenone	0.6	0.8
astaxanthin diester	2.5	15.2
adonirubin ester	tr.	3.2
astaxanthin monoester	4.4	15.2
lutein	44.9	38.9
others	21.5	8.4
total carotenoid ( $\mu\text{g}/21$ . medium)	2200	6500

Table 2. Carotenoid composition of oil drop fraction and whole cell.

carotenoid	sample B <sup>a)</sup>		sample D <sup>b)</sup>	
	oil drop fraction	whole cell	oil drop fraction	whole cell
$\beta$ -carotene	4.2%	9.8%	1.1%	1.6%
echinenone	0.8	0.8	0.5	0.4
astaxanthin diester	36.3	9.2	25.9	25.4
adonirubin ester	tr.	1.5	4.5	4.8
astaxanthin monoester	46.3	13.7	65.7	60.2
others	16.9	64.8	2.3	9.8

a) A little oil drop was found.

b) Large oil drop was found.

Table 3. Change of specific radioactivity of carotenoid of pulse labeled H. lacustris.

carotenoid	dpm./ $\mu$ g				
	time after reincubation(hr)				
	6	27	119	215	263
$\beta$ -carotene	1,400	1,700	1,100	340	340
echinenone	950	970	—	340	—
astaxanthin diester	360	680	1,120	590	510
adonirubin ester	1,300	1,390	—	440	360
astaxanthin monoester	1,170	1,040	570	—	290
lutein	170	380	—	450	430

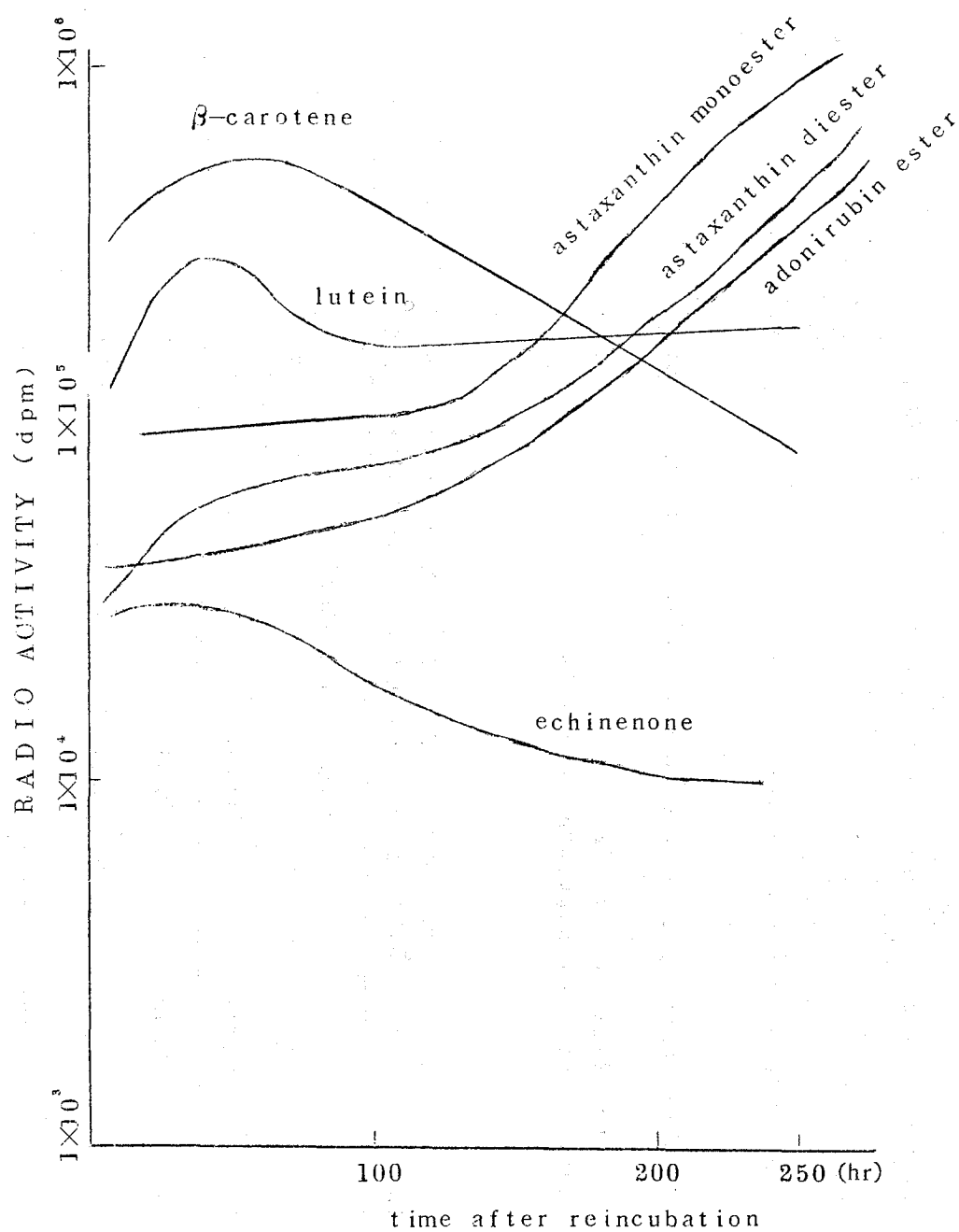


Fig. 2. Change of total radioactivity of carotenoid of pulse labeled *H. lacustris*.



Table 5. Carotenoid of gold fish.

carotenoid	carotenoid amounts ( $\mu\text{g}/\text{fish}$ )	
	group <sup>a)</sup> control	F.P.
astaxanthin ester	2	43
others	6	236

a) Diets of each group are as follows,

control: control diet, contained no carotenoid.

F.P.: control diet + H.lacustris treated with French Press.

Table 6. Carotenoid of sea bream.

carotenoid	carotenoid amounts ( $\mu\text{g}/\text{group}$ )					
	group <sup>a)</sup>					
	1	2	3	4	5	6
astaxanthin ester	—	24	17	72	—	—
others	17	62	58	88	92	106

a) Diets of each group are as follows,

1: control diet; 2: control diet + H.lacustris treated with French Press; 3: control diet + H.lacustris treated by cellulase; 4: control diet + astaxanthin diester;

5: control diet + Scenedesmus; 6: control diet + Spirulina.

Table 7. Astaxanthin ester hydrolysis activity.

enzyme source	$\mu\text{g}$ of hydrolysate/ 50mg of crude enzyme <sup>a)</sup>
RAINBOW TRAUT	
pyloric coeca and intestine	19
CARP	
gut contents	80
intestine	11
GOLD FISH <sup>b)</sup>	
feeding	56
fasting	9

a) substrate: 290  $\mu\text{g}$  of astaxanthin monoester; 20 °C,  
4 hr, pH 8.0.

b) enzyme was extracted from digestive organ and hepato-  
pancreas.

## 審 査 結 果 の 要 旨

ケトカロチノイドの一つであるアスタキサンチンは、動物界に広く分布し、水産動物では魚類、甲殻類などで、それぞれ特有の色彩の主因の色素であり、市場価値を左右する要素の一つとなっているが、動物はその全合成を行なう能力を持たない。一方植物界にはアスタキサンチンを持つものは非常に少ないが、単細胞緑藻の中には、特殊な条件下でこれを異常に多量に蓄積するものがあることが知られており、生物界でアスタキサンチンを全合成する特異な例をなしている。本論文は、緑藻ヘマトコツカス・ラカストリスを選び、そのアスタキサンチンの生合成機作を究明し、さらにこれを水産養殖飼料に添加するアスタキサンチン源として、また、アスタキサンチン代謝研究のための標識アスタキサンチン生合成の生物として利用の可能性を明らかにしたものである。

まず、ヘマトコツカスを純培養しその培養期間の経過に伴うカロチノイドの量的質的变化をしらべ初期には一般の緑藻と同様、 $\beta$ -カロチン、ルテイン、エポキシカロチノイドを主とするが、後期になると総量が増加するとともにケトカロチノイド特にアスタキサンチンが急増し、貧栄養で培養したときにこれが著しいことを認めた。

ついで培地中に  $^{14}\text{C}$ -酢酸ソーダを添加し取り込ませた後に貧栄養培地に移し、培養期間の経過に伴う各カロチノイドの放射能の変化を追跡し、 $\beta$ -カロチン $\rightarrow$ エキネノン $\rightarrow$ アドニルビン $\rightarrow$ アスタキサンチンの系路が存在すること、ルテインはアスタキサンチンに転換されないことを推定した。さらにカロチノイド合成等における環状構造形成阻害剤であるニコチンおよびケト化阻害剤であるピペロニルブトキシaidを加えての培養実験および  $^{14}\text{C}$ - $\beta$ カロチンおよび  $^{14}\text{C}$ -アドニルビンを基質とするホモジネートによるアスタキサンチン生成確認実験により前述の系の存在を確認した。

水産養殖対象動物中サケ・マス類、マダイなどは他のカロチノイドをアスタキサンチンに転換する能力を持たず、体色改善のための飼料にカロチノイドを添加するにあたっては、これがアスタキサンチンでなければならない。本研究では大量にアスタキサンチンを蓄積せしめた試料を、その堅固な膜を破壊するため、フレンチプレス処理または酵素処理したのちにマダイに投与し肉眼的に赤色が増強することおよび表皮のアスタキサンチン量が顕著に増加することを確認した。本種をアスタキサンチン標品の生合成に利用することが可能であるが生成するアスタキサンチンはエステル型であり、通常の化学的な加水分解ではアスタシンを生成する。本研究ではザリガニによる *in-vivo*、魚類消化酵素試料による *in-vivo* の方法でアスタキサンチンをそのエステルから得ることが可能であることを認めた。

以上の如く本論文は、アスタキサンチンを全合成する点で生物中特異な例でありしかも大量にこれを蓄積する単細胞緑藻ヘマトコツカス・ラカストリスを用いて、その生合成経路を究明するとともに、その利用への可能性を明らかにしたもので、審査員一同、博士の学位を与えるに十分な価値を有するものと判定した。